

娄小华,陈莉,吴丹,等. 2009. “活性甲醛”与甲醛远距离毒性的初步研究[J]. 环境科学学报, 29(3): 607 - 612

Lou X H, Chen L, Wu D, et al. 2009. Preliminary study on the activity of formaldehyde and its distant-site toxicity[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 29(3): 607 - 612

## “活性甲醛”与甲醛远距离毒性的初步研究

娄小华,陈莉,吴丹,付小沫,李学彬,赵伟,曹毅,杨旭\*

华中师范大学生命科学学院环境科学实验室, 武汉 430079

收稿日期: 2008-06-17 录用日期: 2009-02-02

**摘要:** 甲醛是否具备远距离毒性 (distant-site toxicity) 是揭示甲醛与白血病关系的关键问题. 本研究采用 DPC、MTT 实验方法检测甲醛的远距离毒性, 结果发现当把等剂量的甲醛与 GSH 联合作用对细胞进行染毒后细胞内产生的 DPC 系数比单独同剂量的甲醛组要高很多, 在 MTT 实验中发现单独甲醛组中加入等量的 GSH 后细胞活性也出现了显著下降; 在动物实验中, 当对小鼠肝染毒后脑组织中也同样出现了损伤. 说明甲醛在机体内与 GSH 形成了结合物, 这种结合物可能协助甲醛完成跨膜并进入到局部组织再次释放出游离态甲醛, 实现了甲醛的远距离毒性, 这种结合态的甲醛称之为“活性甲醛”.

**关键词:** 甲醛 (FA); 谷胱甘肽 (GSH); DNA-蛋白质交联 (DPC); 细胞活性检测; 远距离毒性

文章编号: 0253-2468(2009)03-607-06 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Preliminary study on the activity of formaldehyde and its distant-site toxicity

LOU Xiaohua, CHEN Li, WU Dan, FU Xiaomo, LI Xuebin, ZHAO Wei, CAO Yi, YANG Xu\*

Life Science Department of Hua Zhong Normal University, Wuhan 430079

Received 17 June 2008; accepted 2 February 2009

**Abstract:** The distant-site toxicity of formaldehyde is a key question concerning the relationship of formaldehyde and leukemia. In this study we used DNA-Protein Crosslinks (DPC) and MTT assays to detect the distant-site toxicity of formaldehyde. The results showed that the DPC coefficient of the combined group was much higher than that of the separate group exposed to the same dose of formaldehyde, however, we found the cell activity dropped significantly in the combined group compared to the separate group. The same result was also found in animal experiments. When mouse liver was exposed to formaldehyde, the brain tissue was damaged. In the body, formaldehyde can form a complex with GSH, which may help the formaldehyde cross the cell membrane and re-enter formaldehyde-free cells, inducing a distant-site toxicity. The formaldehyde-GSH complex may be regarded as “active formaldehyde”.

**Keywords:** formaldehyde (FA); glutathione (GSH); DNA-Protein Crosslinks (DPC); MTT; Distant-site toxicity

### 1 引言 (Introduction)

甲醛是一种常见的空气污染物,具有毒性大、持续时间长、作用多样的特点. 甲醛对机体不同组织和细胞均具有多种毒性效应,包括免疫毒性、遗传毒性、致癌效应等 (张瑾, 2006). 但是,关于吸入甲醛是否具有致使远离暴露器官发挥毒性作用的能力 (“远距离毒性”) 一直都是一个争议较大的问题. 部分专家认为 (Heck *et al*, 1985) 甲醛会在暴露的局部组织迅速代谢和清除,不具备产生远距离毒性的条件. 然而远距离毒性是揭示 “甲醛是否能

够引起白血病”的关键问题,如果甲醛具有远距离的遗传毒性,并且能够作用到骨髓组织中的造血细胞,则可以从分子水平解释甲醛吸入与白血病的关系,这对于白血病的预防乃至治疗都具有十分重要的意义 (王昆等, 2006).

目前对于甲醛的毒性效应研究较多,然而对于甲醛究竟是以何种方式进出于组织和细胞,参与机体生理代谢及产生生理效应的研究很少,为了进一步深入研究甲醛的生理作用,甲醛在体内运输和转运的问题成为了亟待解决的问题. 甲醛是高度亲水分子,理论上不易以自由渗透的方式透过脂质膜.

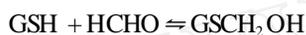
基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No. 30570799)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30570799)

作者简介: 娄小华 (1982—),男, E-mail: xiaohua@yaho.com.cn; \*通讯作者 (责任作者), E-mail: yangxu@mail.ccn.edu.cn

Biography: LOU Xiaohua (1982—), male, E-mail: xiaohualou@yaho.com.cn; \*Corresponding author, E-mail: yangxu@mail.ccn.edu.cn

但另有研究表明甲醛也是一种可能的机体内源性物质,它可以在机体内与多种小分子结合形成结合态甲醛 (James, 1983). Stephen 等研究中发现甲醛能与 GSH 的 -SH 发生结合反应,并生成 S 羟甲基谷胱甘肽 (GSHCH<sub>2</sub>OH),该反应不需要酶的参加,是一个自发的过程,不仅如此,S 羟甲基谷胱甘肽还可以可逆地生成 GSH 和游离态甲醛 (Stephen, 1988). 我们推测这种结合态的甲醛可能在协助甲醛完成跨膜以及甲醛在机体内的转运和实现甲醛远距离毒性中起到重要作用. 甲醛与 GSH 的反应如下:



R<sub>REACTION</sub> 1



R<sub>REACTION</sub> 2



R<sub>REACTION</sub> 3

## 2 材料与amp;方法 (Materials and methods)

### 2.1 仪器与amp;主要试剂

10% 的福尔马林,谷胱甘肽,氧化型辅酶 (NAD<sup>+</sup>),小牛胸腺 DNA 和荧光染料 Hoechst33258 都购自于 SIGMA 公司;1640 培养基和胎牛血清购自于 Merck 公司.

CO<sub>2</sub> 恒温培养箱;低温离心机 (Eppendorf-5415R);尼康荧光显微镜 (E600);F-4500 型荧光分光光度计;超净工作台;1mL 注射器;三用电热恒温水箱.

染毒液:包括 一 号. 分别为: ( ) 去离子水; ( ) 氧化型辅酶 磷酸钾缓冲液 (E-PPB); ( ) GSH 溶液; ( ) 甲醛溶液; ( ) 等量的甲醛和 GSH 混合溶液 (不含 NAD<sup>+</sup>); ( ) 等量的甲醛和 GSH 混合溶液 (含 NAD<sup>+</sup>); ( ) 等量的甲醛和 GSH 混合溶液 (不含 NAD<sup>+</sup>) 经过纯化后所得“活性甲醛”配置的溶液; ( ) 等量的甲醛和 GSH 混合溶液 (含 NAD<sup>+</sup>) 经过纯化后所得“活性甲醛”配置的溶液.

### 2.2 体外实验

细胞分离和培养: HeLa 细胞株购自中国武汉大学细胞培养中心. 细胞在 1640 培养基含 10% 胎牛血清中培养,生长条件为空气湿度 95%,二氧化碳含量 5%,恒温 37,培养基每隔一天换一次.

细胞 DPC 实验:将细胞平均分为 6 管,从第 1 管到第 6 管依次加入染毒液 一染毒液,分别为

空白组、试剂组、GSH 组、甲醛组和“活性甲醛”组. 最后,将所有 EP 管放在 37 的恒温条件下培养 1h,然后检测 DPC 系数.

细胞 MTT 实验: 先配制好 60μmol·L<sup>-1</sup>、120μmol·L<sup>-1</sup>、240μmol·L<sup>-1</sup> 和 480μmol·L<sup>-1</sup> 的甲醛溶液,然后将细胞平均分为 5 管进行染毒,第一管为去离子水染毒组即空白组,2~5 管依次用上述配好的甲醛溶液进行染毒,染毒结束后,孵育 48h 加入 MTT 试剂. 继续置于培养箱中培养 4h,吸去培养上清液,再加入 200μL 二甲基亚砷溶液,振荡器轻轻振荡 10min 后室温下静置 5min,于酶联免疫检测仪分别在波长 490nm 和 450nm 处测量细胞的 OD 值.

在实验 (1) 的甲醛溶液中分别加入一定量 GSH 使其浓度与该组甲醛浓度相同并重复实验 (1),此实验为等量效验 MTT 实验.

### 2.3 体内实验

实验动物筛选和分组: 30 只昆明雄性小鼠 (SPF 级),体重 18~20g,购自中国湖北预防研究所实验动物中心. 将小鼠平均分为 6 组,每组 5 只.

纯化前实验: 将 30 只小鼠平均分为 6 组,每组 5 只小鼠,采取腹腔注射染毒的方法依次注射染毒液 一染毒液,染毒时间持续 14d,每天每只小鼠注射 2 次,上午、下午各一次,每次注射量为 0.01mL·g<sup>-1</sup>. 染毒结束后禁食 1 天后将小鼠脱颈致死,取肝、脑两个器官准备实验. 严格按照 DPC 实验方法和步骤完成实验,并用 Kcl-SDS 法检测 DPC 系数.

纯化后实验:与纯化前实验不同的是 6 组小鼠的染毒液依次为染毒液 一染毒液、染毒液 二染毒液、染毒液 三染毒液、染毒液 四染毒液、染毒液 五染毒液. 其他实验步骤完全相同.

### 2.4 Kcl-SDS 法测定 DPC 系数

在本文的研究中 KCl-SDS 法测定 DPC 系数在 Zhitkovich 和 Chakrabarti 的方法 (Zhitkovich *et al*, 1992; Chakrabarti *et al*, 1999) 上作了些改进并参照刘英帅等的研究 (刘英帅等, 2004). 由于细胞内存在着游离的 DNA 和与蛋白质结合的交联 DNA,交联 DNA 上蛋白质会与 SDS 结合形成复合物沉淀,从而使游离的 DNA 和与交联 DNA 得到分离,通过荧光法计算出交联 DNA 在总 DNA 中所占的比例,即 DPC 系数. 首先收集细胞,6000r·min<sup>-1</sup> 离心 3min,然后将细胞悬浮于 0.5mL pH 值为 7.5 的 PBS 溶液中,再加入 0.5mL 2% SDS 溶液混匀,60 水浴

10min裂解细胞,从水浴中取出后,加入 100 $\mu$ L 的 KCl-Tris-HCl 溶液 (KCl 和 Tris-HCl 终浓度分别为 1.0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 值 7.4),然后将混合液 6 次穿过 1mL 的聚丙烯枪头,从而使 DNA 长度统一,在冰上冷冻样品 5min,观察出现沉淀与否,没有沉淀继续冷冻. 10000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 4 离心 5min 收集沉淀,并将上清转入另一 5mL 离心管中,在沉淀中加入 1mL 的清洗缓冲液,重悬浮沉淀,60 水浴加热 10min,冰上骤冷 5min,10000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 4 离心 5min,重复上述步骤 2 次,每次都应将上清转入同一离心管. 将沉淀悬浮于含蛋白酶 K 终浓度为 0.2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 1mL 清洗缓冲液中,37 水浴消化 3h,从水浴中取出,冰上骤冷 5min,12000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下 4 离心 10min,收集上清液. 将上述样品中分别加入 400 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的荧光染料 Hoechst33258 1mL,置于暗处 30min,用荧光分光光度计测定上述样品荧光值,根据标准曲线来定量交联和自由 DNA 并计算出 DPC 系数.

### 2.5 统计学分析

所有的数据采用 Origin 6.0 统计分析软件进行分析,并用 *t* 检测法检测实验组与对照组之间的差异性,  $p < 0.05$  具有统计学意义.

## 3 结果 (Results)

### 3.1 制作 DNA 标准曲线

作 DNA 浓度的标准曲线:用清洗缓冲液配制终浓度分别为 0、100、300、500、750、1000、1500、2000、3000、5000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的小牛胸腺 DNA 标准液,紧接着加入 1mL 新鲜配制的 400 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 荧光染料 Hoechst33258,使荧光染料的终浓度为 200 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,置于暗处 30min,用 F-4500 型荧光分光光度仪在 350nm 激发光和 450nm 发射光下测得各浓度的荧光值,制备标准曲线,如图 1 所示,回归方程

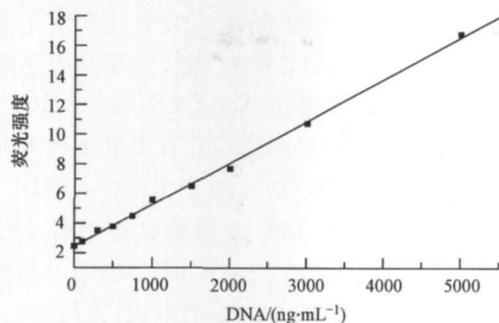


图 1 DNA 浓度的标准曲线

Fig 1 The standard curve of DNA concentration

为:  $y = 2.4423 + 0.0028x$ ,  $r = 0.9988$  将染色后的样品用 F-4500 型荧光分光光度计测定其荧光值,根据标准曲线来定量交联 DNA 和自由 DNA,再计算 DPC 系数.

### 3.2 体外实验结果

3.2.1 HeLa 细胞的 DPC 实验 图 2 说明了 HeLa 细胞 DPC 系数在不同组中的变化情况,其中 FA 组和 FA-GSH 组与空白组相比有极显著差异性 (FA,  $p < 0.01$ ; FA-GSH,  $p < 0.01$ ),这说明了甲醛能导致 DPC 的形成; GSH 组与阳性空白组相比无显著差异性,说明 GSH 不能导致 DPC 的形成; FA-GSH 组与 FA 组相比有显著差异性 ( $p < 0.05$ ),这说明 GSH 可以协同甲醛导致更高的 DPC.

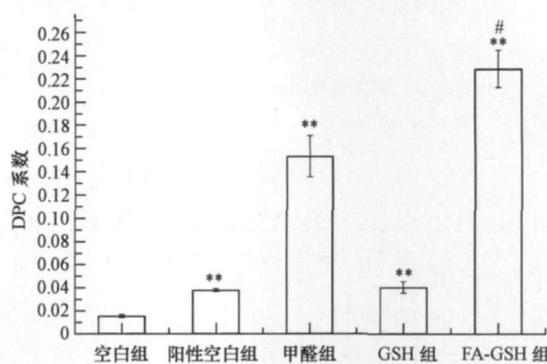


图 2 HeLa 细胞中不同组的 DPC 系数 (\* \* :  $p < 0.01$ , 与空白组对比; #:  $p < 0.05$ , FA-GSH 组与 FA 对比; 最终浓度: FA, 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; GSH, 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )

Fig 2 The DPC coefficient of different groups in HeLa cells

3.2.2 HeLa 细胞的 MTT 实验 MTT 法检测不同浓度的甲醛单独染毒后对细胞活性的影响结果见图 3. 实验结果显示甲醛浓度为 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时与空白组相比细胞活性有增高趋势 ( $p < 0.05$ ),而甲醛浓度逐渐增大为 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、240 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、480 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时,细胞活性开始显著下降,其中 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的浓度下细胞活性与空白组相比有下降趋势,但是没显著差异性,而在 240 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、480 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度下细胞活性与空白组相比出现极显著的下降趋势 ( $p < 0.01$ ). 说明低浓度甲醛对细胞的生长和繁殖具有促进作用,高浓度甲醛对细胞的活性起到了强烈的抑制作用.

等量甲醛与 GSH 自发反应后的混合物对细胞染毒后细胞活性的影响结果见图 4. 实验结果显示,当用等浓度为 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、240 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、480 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  甲醛和 GSH 染毒时,测得细胞吸光度比单

独甲醛  $120\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $240\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $480\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 染毒组均有显著的下陷趋势,差异性分别  $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.01$ .这说明了 GSH协助甲醛完成了跨膜,并促进甲醛导致细胞的调亡.

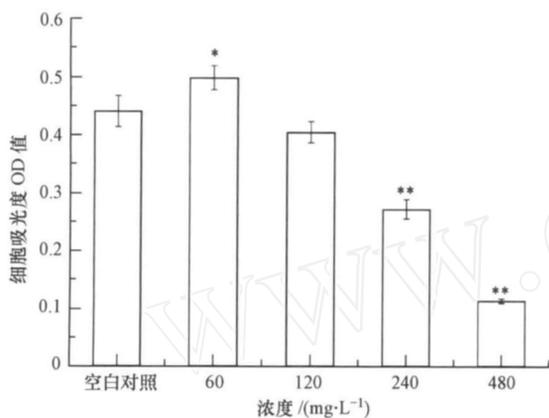


图3 不同浓度甲醛对细胞活性的影响

Fig.3 Effect of different concentrations of HCHO on cell activity

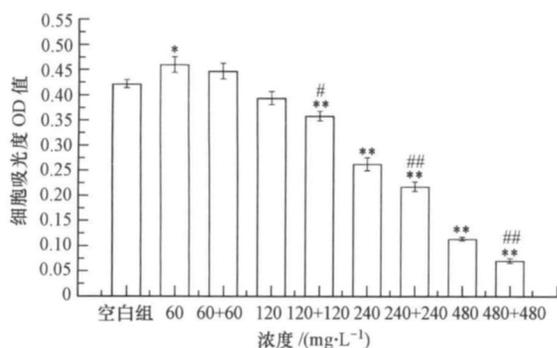


图4 等量甲醛与GSH自发反应后对细胞活性的影响(\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ,与空白组对比; #:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ,  $60\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  甲醛 +  $60\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  GSH组、 $120\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  甲醛 +  $120\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  GSH组、 $240\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  甲醛 +  $240\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  GSH组、 $480\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  甲醛 +  $480\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  GSH组与单独甲醛  $60\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $120\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $240\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $480\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对比)

Fig.4 The same dose of GSH and formaldehyde effect on cell activity

### 3.3 体内实验结果

3.3.1 纯化前的“活性甲醛”所致小鼠肝、脑细胞DPC实验 用 KCl-SDS沉淀法检测纯化前的活性甲醛对小鼠肝、脑细胞致使的DPC实验结果分别见图5.肝和脑实验结果共同显示,甲醛组、F-G(-NAD<sup>+</sup>)组和F-G(+NAD<sup>+</sup>)组与空白组相比均具有极显著性差异( $p < 0.01$ );且F-G(+NAD<sup>+</sup>)组与甲醛组相比所致的DPC系数均显著增高(肝:

$p < 0.01$ , 脑:  $p < 0.05$ ),肝细胞实验中F-G(+NAD<sup>+</sup>)组与F-G(-NAD<sup>+</sup>)组相比有显著差异性( $p < 0.05$ ).说明GSH在甲醛所致的DPC中起到了协同作用,GSH与甲醛形成的“活性甲醛”能导致更高的DPC,而且在添加辅酶的情况下甲醛与GSH更能形成更多的“活性甲醛”,导致更大的细胞毒性.

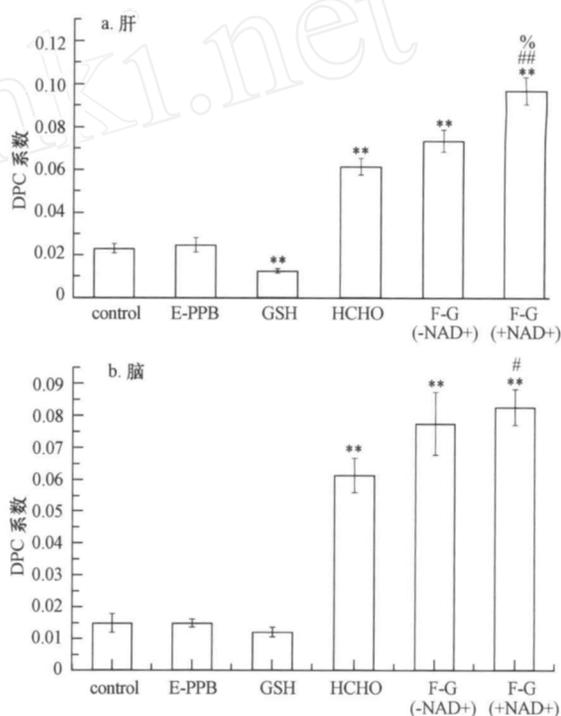


图5 纯化前“活性甲醛”致小鼠肝、脑细胞中不同组的DPC系数(\*:  $p < 0.01$ ,与空白组对照; #:  $p < 0.01$ , FA-GSH组与FA对比; %:  $p < 0.05$ , FA-GSH(+NAD<sup>+</sup>)与FA-GSH(-NAD<sup>+</sup>)对比;最终浓度:FA,  $1000\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;GSH:  $1000\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;FA-GSH <  $1000\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )

Fig.5 DPC coefficient of different groups in liver and brain cells with non-purified “active formaldehyde”

3.3.2 纯化后的“活性甲醛”所致小鼠肝、脑细胞DPC实验 用KCl-SDS沉淀法检测纯化后的活性甲醛对小鼠肝、脑细胞致使的DPC实验结果见图6.实验结果显示,而甲醛组、F-G(-NAD<sup>+</sup>)组和F-G(+NAD<sup>+</sup>)组与空白组相比均具有极显著性差异( $p < 0.01$ );且F-G(-NAD<sup>+</sup>)组和F-G(+NAD<sup>+</sup>)组与甲醛组相比所致的DPC系数均显著增高(肝:  $p < 0.05$ 和  $p < 0.01$ , 脑:  $p < 0.01$ ).说明“活性甲醛”与甲醛相比更能导致DPC的形成,这可能与“活性甲醛”跨膜运输有关.

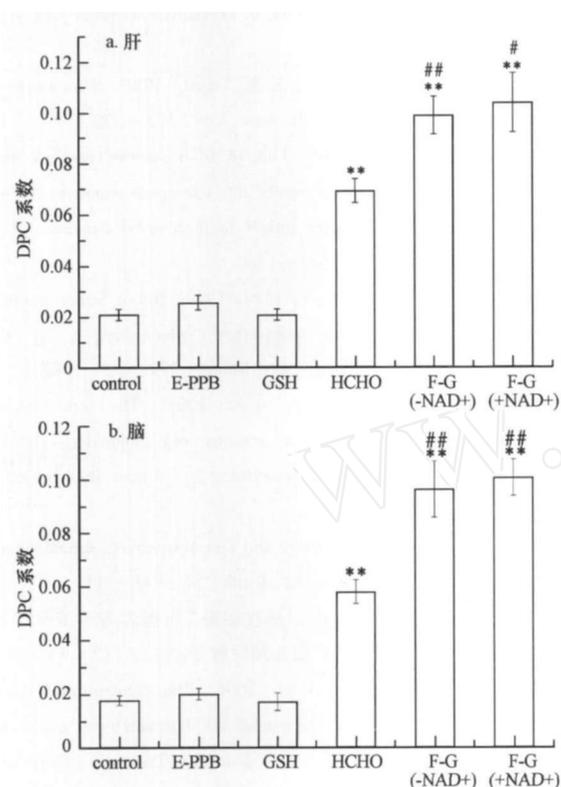


图6 纯化后的“活性甲醛”致小鼠肝、脑细胞中不同组的DPC系数(\* \* :  $p < 0.01$ , 与空白组对照; #:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , FA-GSH组与FA对比; 最终浓度: FA,  $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; GSH:  $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; FA-GSH:  $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

Fig. 6 DPC coefficient of different groups in liver and brain cells with purified “active formaldehyde”

## 4 讨论 (Discussion)

### 4.1 甲醛与“活性甲醛”致组织或细胞DPC的机理

甲醛致DPC的可能机理是:(1)甲醛是醛类化合物中最简单的小分子,其毒性效应的一个重要方面是源于它的羰基亲电性和较小的空间位阻,使其易于与核酸和蛋白质发生交联。在体内或体外甲醛先与蛋白质或核酸上的自由的氨基反应生成不稳定的羟甲基结合物,然后再进一步与核酸或蛋白质反应形成稳定的交联物。甲醛主要引起DNA和组蛋白的交联,该过程是甲醛先快速的和组蛋白反应,然后再和DNA环外的氨基结合形成DPC,主要涉及到组蛋白赖氨酸的氨基和A/G碱基的环外氨基,其主要结构为: histone—NH—CH<sub>2</sub>—NH—DNA (Renee *et al*, 2000; Quievryn *et al*, 2000); (2)甲醛损害生物体抗氧化系统或作为抗氧化酶的抑制剂,间接导致DPC的增加。例如甲醛可以引起还

原性GSH的耗竭,抑制谷胱甘肽过氧化物酶和超氧化物歧化酶等抗氧化酶的活性,使羟自由基和氧自由基清除不力,导致DPC含量的增加(杨旭等, 2003)。

“活性甲醛”致DPC的可能机理: 甲醛与GSH结合形成“活性甲醛”,这种新的物质可能是甲醛跨膜的重要机制,完成了甲醛是亲水小分子,不能跨越细胞膜进入细胞的任务。形成的这种S-羟甲基谷胱甘肽可以在进入细胞或局部组织后释放游离态甲醛,从而造成细胞或组织更大的损伤。聚合态的“活性甲醛”也可能具有一定的活性作用,或许与“活性一氧化氮”具有类似的特征。

### 4.2 HeLa细胞的MTT实验结果探讨

甲醛致使细胞凋亡机理探讨:关于细胞凋亡与线粒体之间的关系已有很多报道(Shimizu *et al*, 1999),其中Wang等(2001)在他的一篇综述中详细地描述了细胞凋亡过程的线粒体中发生的一系列生化事件,阐述了细胞色素C诱导凋亡蛋白激活途径。另外,也有研究者根据细胞凋亡与线粒体间的上述关系专门对甲醛诱导细胞凋亡的一个可能机制进行阐述,Teng等(2001)指出,甲醛可以打开线粒体渗透性转运孔复合物(PTPC),导致细胞色素C的释放,可能进而引发了细胞的凋亡。

在我们的实验结果中发现GSH在甲醛引发的细胞凋亡中起到了协同作用,其机理可能是GSH与甲醛形成的结合物S-羟甲基谷胱甘肽跨膜进入细胞后,由于细胞内甲醛浓度低,使得反应左移,释放出游离态甲醛并引发细胞色素C的释放,进而导致细胞凋亡。

### 4.3 远距离毒性的假说

尽管有人提出吸入甲醛可以转运到远距离组织,并引起癌症,但机制不清楚。Thrasher进行了文献综述,并提出暴露后血液中形成的甲醛介导的加和物可能在远距离毒性中起重要作用,因为甲醛的产生者在肿瘤形成中起重要作用(Thrasher *et al*, 2001)。由于许多酶都可以产生甲醛,我们认为甲醛可能以中间形成转运,并在远距离释放。许多甲醛产生酶类都可以形成过氧化氢,后者可以耗绝GSH,并可能导致甲醛积累。我们认为当讨论远距离毒性的时候,甲醛与分子的反应需要重新考虑。

## 5 结论 (Conclusions)

1)较低浓度的甲醛( $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )能促进细

胞的生长和繁殖,提高细胞活性,而高浓度的甲醛( $120\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )可诱导细胞凋亡;但加入等量的GSH后,细胞活性会比单独甲醛组显著下降,说明GSH在甲醛诱导的细胞凋亡中起到了协同作用。

2)  $1000\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲醛能严重致使细胞内DPC的形成,当加入等量的GSH后,细胞内DPC的形成会加剧,说明GSH在甲醛诱导的DPC中起到了协同作用。

3) 甲醛与GSH形成的加合物——S羟甲基谷胱甘肽或S-甲酰谷胱甘肽能致使更严重的DPC,这种所谓的“结合态甲醛”可能在甲醛跨膜过程中起到了协助作用,为甲醛的远距离毒性提供了理论基础。

责任作者简介:杨旭(1954—),男,华中师范大学生命科学学院教授,博士生导师。从事室内环境污染研究25年多,发表论文200多篇。E-mail: yangxu@mail.ccnu.edu.cn

#### 参考文献 (References):

- Bunde R L, Jarvib E J, Rosentretter J J. 2000. A piezoelectric method for monitoring formaldehyde induced crosslink formation between poly-lysine and poly-deoxyguanosine [J]. *Talanta*, 51: 159—171
- Chakrabarti S K, Bai C J, Subramanian K S, *et al* 1999. “DNA-protein crosslinks induced by nickel compounds in isolated rat renal cortical cells and its antagonism by specific amino acids and magnesium ion” [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 154 (5): 245—255
- Gibson J E (Ed) 1983. *Formaldehyde Toxicity* [M]. New York: Hemisphere Publishing, 154—165
- Heck H d A, Casanova-Schmitz M, Dodd PB, *et al* 1985. Formaldehyde concentrations in the blood of humans and Fischer-344 rats exposed to  $\text{CH}_2\text{O}$  under controlled conditions [J]. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 46: 1—3
- 刘英帅, 鲁志松, 杨继文, 等. 2004. 甲醛致人血淋巴细胞DNA蛋白质交联作用的定量研究 [J]. *湖北预防医学杂志*, 15 (4): 4—7
- Liu Y S, Lu Z S, Yang J W, *et al* 2004. Quantification study on the DNA-protein crosslinks of human blood lymphocytes induced by formaldehyde [J]. *Hubei Journal of Preventive Medicine*, 15 (4): 4—7 (in Chinese)
- Naylor S, Mason R P, Sanders J K M, *et al* 1988. Formaldehyde adducts of glutathione [J]. *Biochem*, 249: 573—579
- Quievryn G, Zhitkovich A. 2000. Loss of DNA-protein crosslink from formaldehyde-exposed cells occurs through spontaneous hydrolysis and an active repair process linked to proteasome function [J]. *Carcinogenesis*, 21 (8): 1573—1580
- Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y, *et al* 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC [J]. *Nature*, 399: 483—487
- Teng S, Beard K, Pourahmad J, *et al* 2001. The formaldehyde metabolic detoxification enzyme systems and molecular cytotoxic mechanism in isolated rat hepatocytes [J]. *Chem Biol Interact*, 130: 285—296
- Thrasher J D. 2001. Embryo toxicity and teratogenicity of formaldehyde [J]. *Archives of Environmental Health*, 56: 300—311
- 王昆, 乔永康, 曹毅, 等. 2006. “活性甲醛”的概念与甲醛分子跨越细胞膜机理的探讨 [J]. *湖北预防医学杂志*, 17 (3): 43—45
- Wang K, Qiao Y K, Cao Y, *et al* 2006. The concept of “active Formaldehyde” and the Mechanism of formaldehyde molecules across cell membranes [J]. *Hubei Journal of Preventive Medicine*, 17 (3): 43—45 (in Chinese)
- Wang X D. 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis [J]. *Genes and Development*, 15: 2922—2933
- 杨旭, 丁书茂. 2003. 室内气态甲醛的毒性作用及其生物标志物 [A]. 首届室内环境安全与可持续发展论坛论文集 [C]. 长沙: 湖南大学出版社, 96—103
- Yang X, Ding S M. 2003. Indoor gaseous formaldehyde toxicity and biological markers [A]. The first indoor environmental security and sustainable development in international forums Papers [C]. 96—103 (in Chinese)
- 张瑾. 2006. 甲醛毒性的研究进展 [J]. *职业与健康*, 22 (23): 2041—2044
- Zhang J. 2006. The progress research of formaldehyde toxicity [J]. *Careers and Health*, 22 (23): 2041—2044 (in Chinese)
- Zhitkovich A, Costa M. 1992. “A simple, sensitive assay to detect DNA-protein crosslinks in intact cells and in vivo” [J]. *Carcinogenesis*, 13 (8): 1485—1489